动 物 学 研 究 1996, 17 (3): 301—305 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

蓝氏贾第虫组蛋白的初步研究

吴 刚 李靖炎
(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)
卢思奇
(首都医科大学寄生虫学教研室 北京 100054)

摘要 本文初步比较分析了贾第虫组蛋白的存在及其基本组成。通过甲醇固定，两次0.3 mol/L HCl抽提及丙酮沉淀，提取贾第虫酸溶性蛋白、利用亲和层析制取总DNA结合蛋白，经酸性尿素系统及SDS系统电泳分析表明，贾第虫已存在5种组蛋白，其在两种不同性质电泳系统中的电泳行为与相应的小牛胸腺组蛋白有近似的对应关系。说明贾第虫的组蛋白已发生了分化，并已初步形成了性质不同的几个组份，从而在一定程度上支持核小体组蛋白在真核生物的原核祖先阶段就已产生了分化的假说。

关键词 蓝氏贾第虫、组蛋白，进化

组蛋白作为染色质的组成部分在染色质结构与功能的进化中占着极为重要的地位。然而目前对组蛋白的了解仅限于高等真核生物及少数原生生物中的类型，即由4种核心组蛋白与非核心组蛋白H1组成的典型模式，而在已经具有核膜结构的最低等真核生物中是否也存在该模式，也就是说它们的核心组蛋白或原始组蛋白是仍然与某些原细菌类相似只有1种，还是已经分化成了4种，迄今对此毫无所知。细胞及其所有结构都是进化的产物，要全面深入地认识真核生物的染色质就必须从进化的角度加以考察，因而设法了解低等真核生物组蛋白的存在与进化方式就显得颇为必要了。

在诸多现存低等真核生物中，现今已知最为低等的是被Gavalier-Smith (1991) 称之为Archezoa (源真核生物) 的单细胞生物类群。该类生物的结构最为简单，由于不具有线粒体和典型的高尔基氏器，保留着70S型核糖体以及其它与原核生物相似的性征而被认为是真核生物的最早分枝类群。已知属于这一类群的有微孢子虫类、双滴虫类和部分内变形虫类等。

蓝氏贾第虫 (*Giardia lamblia*) 为单细胞原生动物，寄生于人体消化系统，其生活史分为滋养体和包囊两个时期，具两个遗传功能等同的细胞核，无线粒体，仅有能行使高尔基氏器功能的高尔基氏小泡，保留着原核生物型的核糖体。据此Cavalier-Smith (1987) 推测贾第虫可能是最先出现的厌氧真核生物，此观点后为Vossbrinck (1987) 和Sogin等 (1989) 以核糖体小亚基RNAs (SrRNAs) 顺序比较建立的系统进化树所支持。基于贾第虫所处的特殊进化地位，以及至今未见有关贾第虫核心组蛋白的组成和结构形式的报道，本文以凝胶电泳方法初步分析了其组蛋白的存在类型。

本文1995年7月7日收到，同年11月28日修回

1 材料与方法

1.1 材料

蓝氏贾第虫（*Giardia lambila*）为 Lu Si-qi 等（1990）自北京一贾第虫病患者粪便中分离纯化的 BEIJ88／BTMRI／1 纯株，培养基及培养方法与 Lu 等（1990）法相同。

苯甲基磺酰氟（PMSF）为华美公司产品，DNA-纤维素（双链）、偶氮洋红 G（Azocarmine G）、乙二胺四乙酸（EDTA）等为 Sigma 公司产品，其余主要化学试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 碱性蛋白提取 参照 Rizzo 等（1972）的稀酸提取法。将培养 3 天的贾第虫滋养体培养液于 4℃预冷 1 h，使虫体脱壁，于 160 r／min 离心 10 min，收集虫体，以生理盐水洗涤虫体 3 次。以下操作均在 4℃以下进行，分别于经甲醇固定 10 min、0.5 h、1.5 h 的虫体内加入少许酸性抽提液（0.3N HCl，内含 1.2 mmol／L PMSF，1 mmol／L EDTA），匀浆破细胞 5 min，加入 4 倍体积抽提液抽提 30 min，2000 r／min 离心 10 min，以丙酮沉淀碱性蛋白，沉淀经真空干燥后再重复酸抽提和丙酮沉淀 1 次，然后以丙酮洗涤沉淀两次，将获得的总碱性蛋白冰冻干燥。同法制备小牛胸腺组蛋白粗品。

1.2.2 DNA 亲和层析 参照 Melya（1991）等的方法进行。分别利用贾第虫总碱性蛋白和小牛胸腺组蛋白粗品制备相应的总 DNA 结合蛋白（即总组蛋白粗品），脱盐处理后用于电泳分析。

1.2.3 SDS 系统电泳 参照 Laemmli（1970）的方法。垂直板型，浓缩胶聚丙烯酰胺浓度 T＝15%，胶联度 C＝1.31%，pH6.7；分离胶 T＝16%，C＝0.66%，pH8.8，样品溶解液含 1%巯基乙醇。电流强度 10 mA。电泳后依次以 10%三氟乙酸固定，SDS 洗脱液（甲醇：乙酸：水＝3：3：4）洗脱 SDS，10%甲醇洗胶至中性，含 0.1%偶氮洋红 G 的 10%甲醇溶液染色分析。

1.2.4 酸性尿素系统电泳 参照 Sakol 等（1969）的方法。垂直板型，聚丙烯酰胺凝胶浓度 T＝15%，C＝0.625%，凝胶、电极液及样品溶解液的尿素浓度均为 6.0 mol／L，pH3.4。电流强度 10 mA。电泳后于中性状态以 0.1%偶氮洋红 G 染色分析。

2 结果

经甲醇固定 10 min 的贾第虫组蛋白的 SDS 电泳结果如图 1，可分辨出 7 条蛋白主带，其中 5 条带的电泳迁移率分别与小牛胸腺 5 种组蛋白相近，只是与 H4 及 H3 相应的贾第虫蛋白染色带位置稍微偏高，即分子量稍大。与小牛胸腺组蛋白不同，H1 位置的贾第虫染色带仅有 1 条，在 H1 与 H3 之间还存在两条功能不清的蛋白带。

酸性尿素电泳的结果如图 2，贾第虫也存在与小牛胸腺 5 种组蛋白相对应的蛋白染色带。

随着甲醇对贾第虫固定时间的延长，SDS 电泳凝胶上与小牛胸腺组蛋白 H4、H3 和 H2a 相应位置的贾第虫蛋白染色带颜色逐渐变浅，与 H4 对应的蛋白带几乎完全消失，如图 3 所示。说明这些贾第虫 DNA 结合蛋白经甲醇固定后的酸溶性下降。小牛胸腺组蛋白则未出现此现象。

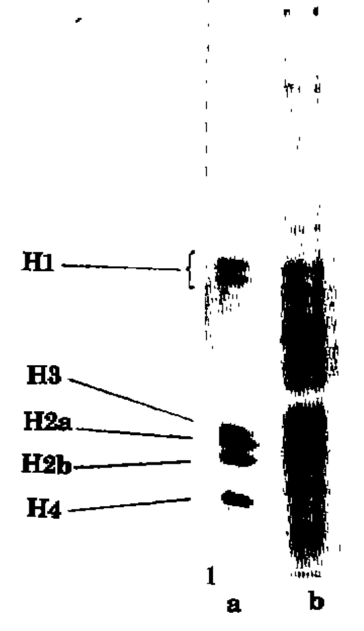


图1 贾第虫组蛋白与小牛胸腺组蛋白的 SDS 电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis of histones of *G. lamblia* and calf thymus on SDS gel staining with azocarmine G

a 小牛胸腺组蛋白(Calf thymus histones),

b. 贾第虫组蛋白(*G. lamblia* histones).

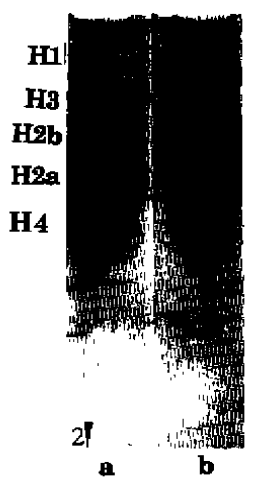


图2 贾第虫组蛋白与小牛胸腺组蛋白的酸性尿素电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis of histones of *G. lamblia* and calf thymus on 6.0 mol／L urea gel staining with azo－carmine G

a 小牛胸腺组蛋白(Calf thymus histones);

b. 贾第虫组蛋白(*G. lamblia* histones).

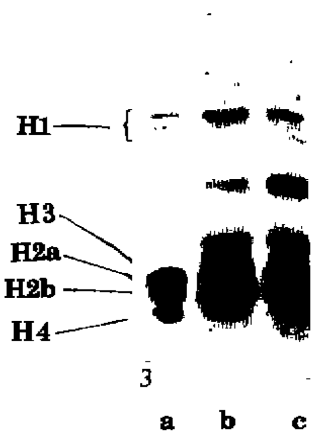


图3 甲醇固定对贾第虫组蛋白与小牛胸腺组蛋白提取量的影响

Fig.3 Effect of fixing on histones of *G. lamblia* and calf thymus with methanol at 0℃. Electrophoresis conditions: SDS gel, T＝16%, 10 mA, staining with azo－carmine G

a 小牛胸腺(固定 1.5 h)[Calf thymus (fixing for 1.5 h)];

b. 贾第虫(固定1.5 h)[*G. lamblia* (fixing for 1.5h)];

c. 贾第虫(固定 0.5 h)[*G. lamblia* (fixing for 0.5 h)].

3 讨论

为确保贾第虫染色质碱性蛋白在抽提过程中不致被水解以及排除实验结果中其它蛋白带假象存在的可能，在制备样品时、利用甲醇固定虫体，低温操作，0.3 mol／L HCl 的极低 pH 条件，以及提取液中蛋白酶抑制剂 PMSF 和 EDTA 的存在，避免了蛋白酶对组蛋白的作用以及水解高分子蛋白质产生与核心组蛋白相似的小分子碱性蛋白的可能性，并通过 DNA 亲和层析除去非 DNA 结合蛋白。此外，同时采用以荷电状态为基础的尿素系统电泳和以分子量及分子形状为基础的 SDS 系统电泳进行分析，消除蛋白质单一性质相似的偶然性。更由于作为染色剂的偶氮洋红 G 的中性溶液只专特地使染色质碱性蛋白着色（李靖炎，1964)，因而贾第虫存在与典型真核生物组蛋白相似的 DNA 结合蛋白的结

论是可信的。

虽然贾第虫组蛋白与小牛胸腺相应组蛋白的迁移率（Rf值）相近，但并非完全相等，同时从图3中可见，小牛胸腺细胞经甲醇固定1.5 h甚至更长时间，仍能以0.3N HCl抽提出大量的核心组蛋白，但贾第虫经甲醇固定，随固定时间的延长，DNA结合蛋白的可抽提种类和提取量都逐渐下降。此现象也曾为张建文等（1988）在砂鼠利什曼原虫上所遇见，暗示这些低等真核细胞与高等真核细胞在染色质结构方面，或者在染色质碱性蛋白与相应的组蛋白的结构方面可能有所不同，由于进化水平的不同这种微小的差异是可以理解的。

Reack等（1978）根据5种组蛋白一级结构的比较已指出4种核心组蛋白有一共同的起源，组蛋白H1则有另外的来源。自70年代起已先后有一些实验室研究各种原核生物体内的染色质蛋白，并已取得了不少成果。但是真正与真核生物的核心组蛋白在起源上有紧密关系的蛋白直到1990年方才为美国Reeve的实验室从一种嗜高温的原细菌——产甲烷热菌（*Methanthermus fervidus*）体内找到（1990）。这种蛋白被命名为HMf蛋白，在氨基酸序列上与4种核心组蛋白都很明显地相似。HMf蛋白的发现已经证实了Reeck等的推测。关于从核心组蛋白的原核祖先分子如何进化为真核生物的4种核心组蛋白，一种可能性是祖先分子在原核生物阶段即已分化成了4种；另一种可能是这种祖先在真核细胞已经进化形成以后方才分化成为4种核心组蛋白。在系统进化上，与真核生物最为接近的原细菌（archeabacteria）方面，虽则Searcy（1988）报道的*Thermoplasma acidophilum*和Karin等（1993）报道的*Methanococcus voltae*体内都只存在一种类组蛋白，分别称之为HTa和HMV，都未出现类组蛋白的分化，而HMf蛋白和Romana（1992）从*Methanobacterium thermoautotrophicum*中提取的类组蛋白都已分化成极为相似的两种类型，分别称为HMf1、HMf2和HMt1、HMt2。这样看来组蛋白在细胞未进化至真核类时就已开始分化是有可能的。本工作也未能证实核心组蛋白进化的后一种可能性，从而增强了前一种可能。但是源真核生物并非只有贾第虫一类，原细菌中的产甲烷细菌的种类也极其繁多，因此还需要在其它源真核生物和原细菌体内作类似的检查。此外也还需要对贾第虫与典型真核生物的核心组蛋白作更为深入的比较。

参 考 文 献

李靖炎，1964. 皮肤表皮细胞核中碱性蛋白之变化的初步研究. 中国动物学会三十周年学术讨论会论文摘要汇编，第三分册. 北京：科学出版社. 407.

张建文，李靖炎，1988. 砂鼠利什曼原虫（*Leishmania gerbilli*）染色质与动基体碱性蛋白的初步研究. 动物学研究，9(3)：269.

Cavalier-Smith T, 1991 Evolution of life: fossils, molecules, and culture. Osawa S, Honjo T, eds. Tokyo: Springer-Verlag. 271.

Cavalier-Smith T, 1987. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, **326**: 332.

Karin Agha-Amiri, Alberche K, 1993. Nucleotide sequence of a gene encoding a histone-like protein in the archaeon Methanococcus voltae. *Nuc. Act Research*. **21**(6): 1491.

Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680.

Melya J H *et at*, 1991. Purification of sequence-specific DNA-binding proteins by affinity chromatography. *BioMethods*. 5: 221.

Reeck G R, Swanson E, Teller D C *et al*, 1978. The evolution of histones. *J. Mol. Evol.*, **10**: 309.

Rizzo P J, Nooden L D, 1972. Chromosomal proteins in the dinoflagellate algae *Gyrodinium cohnii*. *Science*. **176**: 796

Romana T. Tabassum R, Sandman K M *et at*, 1992. HMt, a histone-related protein from *Methanobacterium thermoautotrophicum* △H. *J. of Bacteriology*. **174**(24): 7890.

Sakol Panyin, Tabassum R, Sandman K M *et al*, 1969. High resolution acrylamide gelelectrophoresis of histones. *Archives of Biochem. and Biophy.*. **130**: 337.

Sandman K M, Krzycki J A, Dobrinski B *et al*, 1990. HMf, a DNA-binding protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*, is most closely related to histones. *Biochemstry*. **87**: 5788.

Searcy D C, 1986. The archaebacterial histone "HTa". Bacterial Chromatin (ed. by Gualerzi C O and Pon C L). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 175.

Lu Si-qi, Wang Zheng-yi, Zhu Hong *et al*, 1990. Establishment of an axenic culture of *Giardia lamblia* throough preliminary passage in suckling gerbil. *Chinese Medical J.*, **103**(7): 583.

Sogin M L, Gunderson J H, Elwood H J *et al*, 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia* lamblia. *Science*. **243**: 75.

Vossbrinck C R, Maddox J V, Friedmant S *et al*, 1987 Riboomal RNA sequence sugests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*. **326**: 411

PRELIMINARY STUDY ON THE HISTONES OF *Giardia lamblia*

Wu Gang　　Li Jingyan

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Lu Siqi

(*Section of Parasitology, Capital University of Medicine, Beijing* 100054)

Abstract

About how the prokaryotic ancestor molecular of core histones evolved into four kinds of core histones of eukaryote has two possibilities: one is the ancestral molecular had already differentiated into four kinds at stage of prokaryote, the other is this differentiation occured after the cell evolving into the eukaryotic cell. HMf and HMt, two kinds of histone-related proteins, isolated respectively from *Methanothermus fervidus* and *Methanobacterium thermoautotrophicum* △H, Archaebacteria which are most closely related to eukaryote, by reeve's laboratory have already differentiated into HMf1, HMf2 and HMt1, HMt2. Up to now, the core histones found from lower eukaryotic cell, such as *Leishmania* and *Tetrahymena*, have all differentiated into four kinds. In this paper, the total histones were prepared from *Giardia lamblia*, the most primitive eukaryotic cell, by engaging in methanol prefixation, two times of 0.3 mol / L HCl extraction, acetone precipitation and DNA affinity chromatography. The results of electrophoresis, SDS gel (Fig.1) and acid urea gel (Fig.2), of the *Giardia* histones showed that seven major protein bands could be resolved, and five of these bands migrated to position similar those of five kinds of calf thymus histones. It seems, therefore, that the *Giardia* histones have already differentiated and consisted of at least five kinds of histones, and, on certain extent, this supported the hypothesis that the histone had already differentiated into four different kinds at the stage of prokaryotic ancestor of eukaryote.

Key words　*Giardia lamblia*, Histone, Evolution